



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 44 12 794 A 1**

⑳ Aktenzeichen: P 44 12 794.4  
㉔ Anmeldetag: 14. 4. 94  
㉕ Offenlegungstag: 14. 12. 95

㉖ Int. Cl.<sup>6</sup>:  
**C 12 N 5/00**  
C 12 N 5/08  
C 07 K 14/475  
C 07 K 14/54  
C 07 K 14/525  
C 07 K 14/53  
C 07 K 14/505  
C 07 K 14/57  
C 12 M 3/00

DE 44 12 794 A 1

㉗ Anmelder:

Klinikum der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg,  
79106 Freiburg, DE

㉘ Vertreter:

Lederer, Keller & Riederer, 80538 München

㉙ Erfinder:

Kanz, Lothar, Prof.-Dr., 79104 Freiburg, DE; Brugger,  
Wolfram, Dr., 79199 Kirchzarten, DE; Henschler,  
Reinhard, Dr., 79106 Freiburg, DE; Köhler, Gabriele,  
Dr., 79104 Freiburg, DE; Schaefer, Hans-Eckart, Prof.  
Dr., 79111 Freiburg, DE

㉚ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit  
in Betracht zu ziehende Druckschriften:

EP 05 63 485 A1  
Chemical Abstracts, Vol. 119, 1993, Ref. 70110k;

㉛ Verfahren zur Herstellung von dendritischen Zellen, so erhaltene Zellen und Behälter zur Durchführung  
des Verfahrens

㉜ Dendritische Zellen sind als Antigen-präsentierende Zellen  
in therapeutischer Hinsicht interessant. Offenbart wird ein  
Verfahren, bei dem zunächst periphere Blutzellen isoliert  
und daraus die Blutvorläuferzellen, die das CD 34-Antigen  
exprimieren, angereichert werden. Diese Zellen werden mit  
einer Kombination von hämatopoetischen Wachstumsfakto-  
ren und Cytokinen ex vivo expandiert. Über einen Zeitraum  
von 10-20 Tagen entstehen daraus vor allem dendritische  
Zellen, die gegebenenfalls noch weiter gereinigt werden  
können. Diese Zellen sind funktionell aktiv hinsichtlich der  
Fähigkeit zur Antigenpräsentation.

DE 44 12 794 A 1

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung von dendritischen Zellen, die nicht nur in der Grundlagenforschung Anwendung finden können, sondern auch in therapeutischer Hinsicht vorteilhafterweise verwendet werden können.

Dendritischen Zellen stellen die potentesten Antigen-präsentierenden Zellen des Organismus dar. Sie leiten sich von Knochenmarksvorläuferzellen ab, zirkulieren in geringer Anzahl im peripheren Blut und zeigen sich als terminal differenzierte Zellen, sogenannte Langerhans-Zellen in der Epidermis der Haut, der Gastrointestinal-Mukosa, viszerale Pleura oder Epithelien des Urogenitaltraktes.

Nach Antigenexposition wandern diese Zellen aus der Haut in den Parakortex drainierender Lymphknoten, wo sie eine spezifische T-Zellantwort auslösen. Die Funktion als Antigenpräsentierende Zellen läßt sich in vitro nachweisen in der autologen und allogenen "gemischten Lymphozytenreaktion" sowie in Testsystemen, in denen lösliche Antigene zugesetzt werden.

Die dendritischen Zellen lassen sich von Monozyten/Makrophagen abgrenzen, die ebenfalls Antigen-präsentierende Zellen darstellen, jedoch andere Oberflächenmarker exprimieren. Ein Unterscheidungsmarker ist insbesondere das CD 14-Antigen, welches bei dendritischen Zellen nicht gefunden wird, wohingegen Monozyten bzw. Makrophagen dieses Antigen aufweisen. Im Unterschied zu den Monozyten/Makrophagen, die stark phagozytierende Zellen sind, weisen diese Eigenschaft die dendritischen Zellen nicht auf. Bei den zirkulierenden dendritischen Zellen lassen sich die Oberflächenantigene wie folgt definieren: CD 1a<sup>+</sup>, CD 1c<sup>+</sup>, CD 13<sup>+</sup>, CD 33<sup>+</sup>, CD 14<sup>-</sup>, CD 16<sup>-</sup>, CD 3<sup>-</sup>, CD 19<sup>-</sup>, MHC 11<sup>+</sup>.

Nach Kultivierung der Zellen in vitro bzw. nach physiologischer Stimulierung durch Antigen nimmt die Expression der MHC-II-Moleküle zu, ebenso findet sich eine Expression CD 25, B 7, CD 40 und ICAM 1.

Verwendung finden können die dendritischen Zellen beispielsweise bei der Verstärkung einer antiinfektiösen Therapie. Die Antigen-präsentierenden dendritischen Zellen sind von besonderer Bedeutung bei viralen und bakteriellen Infektionen und eine Zugabe dieser Zellen bei den entsprechenden Infektionen kann insbesondere bei schweren Fällen vorteilhafte Auswirkungen auf den Patienten haben. Ein anderes Einsatzgebiet wäre die Impfung, weil hierdurch die Immunantwort des Körpers verstärkt wird.

Gerade bei Patienten, die sich einer Chemotherapie aufgrund einer Tumorerkrankung unterziehen müssen, ist die Bekämpfung von verschiedenen bakteriellen bzw. viralen Infektionen ein Problem, weil durch die Chemotherapie die Immunantwort des Patienten drastisch reduziert wird. Es ist daher erforderlich, daß gerade in diesen Fällen die Immunantwort verbessert wird. Darüberhinaus können dendritische Zellen insbesondere bei der Therapie der minimal residuellen Erkrankungen verwendet werden. Hierbei werden tumorspezifische Antigene von den dendritischen Zellen präsentiert, die dann eine T-Zell-spezifische (cytotoxische) Reaktion hervorrufen.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zur ex vivo Expansion von dendritischen Zellen kann folgendermaßen vorgegangen werden: Von den Patienten werden heparinisierte Blutproben erhalten. Mononukleare Zellen (MNZ) von dem Aphereseprodukt werden durch

geeignete Trenntechniken, vorzugsweise durch eine Dichtegradientenzentrifugation über Ficoll (Pharmacia, Deutschland) isoliert.

Die mononuklearen Zellen werden weiter behandelt, um diejenigen Zellen anzureichern, die das CD 34-Oberflächenantigen besitzen. In der Veröffentlichung "Engraftment After Infusion of CD 34<sup>+</sup> Marrow Cells in Patients With Breast Cancer or Neuroblastoma" (Blood, Vol. 77, Nr. 8 (1991) S. 1717—1722) haben Berenson et al. das CD 34-Antigen beschrieben. Die Anreicherung dieser Zellen kann dadurch erfolgen, daß die Zellen mit einem monoklonalen Antikörper inkubiert werden, der spezifisch ist für das CD 34-Antigen, wobei der Antikörper vorzugsweise biotinyliert ist. Derartige monoklonale Antikörper können käuflich erworben werden, beispielsweise von Dianova, Coulter, CellPro oder Becton Dickinson. Die mit dem monoklonalen Antikörper behandelten Zellen werden auf Immunoaffinitätsäulen, vorzugsweise Avidin-Immunoaffinitätsäulen, geladen, wobei das Avidin die monoklonalen Antikörper bindet und folglich auch die hieran gebundenen, CD 34<sup>+</sup>-Zellen. Die absorbierten Zellen mit dem CD 34-Oberflächenantigen werden von der Immunoaffinitätsäule entfernt und in ein geeignetes Medium gebracht.

Ebenso könnten die für das CD 34-Antigen spezifischen monoklonalen Antikörper auch direkt an eine Festphase (z. B. kleine Perlen etc.) gebunden werden, um die CD 34<sup>+</sup>-Zellen zu fixieren und aus der Mischung zu entfernen.

Weiterhin ist es möglich, die CD 34<sup>+</sup>-Zellen unter Verwendung eines fluoreszenzaktivierten Zellsortierers anzureichern, der käuflich erhältlich ist, beispielsweise von Becton Dickinson. Bei diesem Verfahren werden mobilisierte periphere Blutvorläuferzellen mit einem Anti-CD 34-Antikörper, der eine Fluorochrommarkierung hat, umgesetzt. Mit der Hilfe des fluoreszenzaktivierten Zellsortierers ist es möglich, die Zellen zu trennen, um die CD 34<sup>+</sup>-Zellen zu erhalten. Auf diese Weise können hoch gereinigte Zellen erhalten werden. Eine andere Möglichkeit wäre es, die CD 34<sup>+</sup>-Zellen dadurch abzutrennen, daß magnetische Perlen (beads) verwendet werden, die von Dynal, Baxter, Milteny und anderen Firmen käuflich erhältlich sind.

Die angereicherten CD 34<sup>+</sup>-Zellen wurden anschließend in einem geeignetem Kulturmedium kultiviert. Ein derartiges Medium ist beispielsweise ergänztes RPMI 1640-Medium, das 10% fötales Kälberserum enthält. Das Kulturmedium kann auch heparinisiertes autologes Plasma, vorzugsweise in einer Konzentration von etwa 1% enthalten.

Bei der Expansion der Zellen wurden die Zellen in Gegenwart einer Kombination von verschiedenen Wachstumsfaktoren angezogen. Hierbei wurden die folgenden Wachstumsfaktoren verwendet:

"Interleukin-1 (IL-1), beschrieben von Gery I. et al., Method Enzymol. 116, 456—467 (1985); Lachmann et al., Methods Enzymol. 116, 467—497 (1985); March et al., Nature 315, 641 (1985); Interleukin-3 (IL-3), beschrieben in EPA 138 133, Ihle et al., Methods Enzymol. 116, 540—552 (1985); Otsuka et al., J. Immunol. 140, 2288—2295 (1988); Interleukin-6 (IL-6), beschrieben in Brakenhoff et al., J. Immunol. 139, 4116—4121 (1987), Brakenhoff et al., J. Immunol. 143, 1175—1182 (1989); Erythropoietin (EPO), beschrieben von Jacobs et al., Nature 313, 806—810 (1985), Sasaki et al., Methods Enzymol. 147, 328—340 (1987); Stammzellfaktor (SCF), beschrieben in WO 91/05 797,

Nocka et al., EMBO J. 9, 3287—3294 (1990) und Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), beschrieben in EP 77 670, Gray et al., Nature 295, 503—508 (1982); Devos et al., Nucl. Acids Res. 10, 2487—2501 (1982); Yip et al., PNAS 79, 1820—1824 (1982) und Braude, Methods Enzymol. 119, 193—199 (1986)."

Es wurde herausgefunden, daß durch eine Kombination der folgenden Wachstumsfaktoren: IL-1, IL-3, IL-6, EPO und SCF eine Expansion der CD 34<sup>+</sup>-Vorläuferzellen erfolgt. Wenn diese fünf Wachstumsfaktoren eingesetzt wurden, konnten etwa 1 bis 5% dendritische Zellen, die das Oberflächenantigen CD 1a exprimieren, erhalten werden. Derartige Zellen können auch elektronenmikroskopisch durch den Nachweis der sogenannten Bierbeck-Granula identifiziert werden. Durch die Zugabe von TNF- $\alpha$  und GM-CSF konnte die Ausbeute an dendritischen Zellen deutlich erhöht werden.

Die Zellen werden in Gegenwart der Wachstumsfaktoren IL-1, IL-3, IL-6, EPO und SCF kultiviert.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Expansion der Zellen in Gegenwart einer Kombination von SCF, GM-CSF und TNF- $\alpha$ .

Gegebenenfalls kann noch zusätzlich IL-4 (Interleukin-4) zugesetzt werden (10—1000 ng/ml).

Sofern eine einheitliche Population von dendritischen Zellen für den gewünschten Einsatzzweck erforderlich ist, können die dendritischen Zellen durch entsprechende Trennverfahren angereichert bzw. gereinigt werden. Ein Trennverfahren könnte beispielsweise darin bestehen, daß die Zellen mit monoklonalen Antikörpern umgesetzt werden, die gegen das CD 1a-Oberflächenantigen gerichtet sind. Diese Zell-Antikörper-Komplexe können dann auch über Immunoaffinitätsäulen oder FACS (Fluoreszenz aktivierte Zellsorter) aufgetrennt werden.

Die verwendete Konzentration der Wachstumsfaktoren bzw. Cytokine liegt innerhalb der gewöhnlich verwendeten Konzentration, die die höchste Effizienz in ex vivo Kulturen aufweist. IL-1 kann in einer Konzentration im Bereich von 10 ng/ml bis 1000 ng/ml verwendet werden, IL-3 wird in einer Konzentration von 1 E/ml bis zu 1000 E/ml verwendet, IL-6 wird von 10 E/ml bis zu 1000 E/ml verwendet. EPO kann in einer Konzentration im Bereich von 0,1 E/ml bis 10 E/ml vorhanden sein. SCF wird zwischen 10 ng/ml bis zu 1000 ng/ml verwendet und IFN- $\gamma$  kann im Bereich von 1 E/ml bis 1000 E/ml verwendet werden. Für GM-CSF liegen die verwendeten Konzentrationen zwischen 10 ng/ml und 1000 ng/ml und für TNF- $\alpha$  zwischen 10 E/ml und 1000 E/ml.

Die bevorzugten Bereiche für IL-1 liegen zwischen 50 ng/ml und 150 ng/ml, für IL-3 zwischen 50 E/ml und 150 E/ml, für IL-6 zwischen 50 E/ml und 150 E/ml, für EPO von 0,5 E/ml bis 1,5 E/ml, für SCF von 50 ng/ml bis 150 ng/ml, für GM-CSF von 50 ng/ml bis 200 ng/ml, für TNF- $\alpha$  von 20 E/ml bis 150 E/ml und für IFN- $\gamma$  von 50 E/ml bis 150 E/ml. Es liegt im Bereich der Fähigkeiten des Durchschnittsfachmannes, die beste Wirkungsfähigkeit der Wachstumsfaktoren bzw. Cytokine zu bestimmen. Für die oben angegebenen Einheiten gibt es international anerkannte Normen.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden die peripheren Blutvorläuferzellen von krebserkrankten Patienten erhalten, die durch herkömmliche Chemotherapie und koloniestimulierende Faktoren mobilisiert wurden, um eine Behandlungstherapie mit breiter Antitumoraktivität mit der gleichzeitigen Mobilisierung von peripheren Blutvorläuferzellen zu kombinieren. Eine Mobilisierung kann

erhalten werden durch Behandlung der Patienten mit einer Standarddosierung VP 16 (500 mg/m<sup>2</sup>) Ifosfamid (4 g/m<sup>2</sup>) Cisplatin (50 mg/m<sup>2</sup>) und gegebenenfalls Epirubicin (50 mg/m<sup>2</sup>) (VIP (E) Therapie), gefolgt von der Verabreichung von G-CSF (erhältlich von Amgen) in einer Dosierung von 5  $\mu$ g/kg/d subkutan für 12 bis 14 Tage. Ebenso ist es möglich, GM-CSF zu verabreichen, was zum Beispiel unter dem Warenzeichen "Leukomax" von Sandoz AG, Basel kommerziell erhältlich ist. Die Krebspatienten können auch mit einer Chemotherapie behandelt werden bestehend aus Etoposid (VP 16), Ifosfamid und Cisplatin gefolgt von der kombinierten sequentiellen Verabreichung von rekombinantem Human-interleukin-3 (rhIL-3) und rekombinantem humanem Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierendem Faktor (rhGM-CSF).

Es ist besonders bevorzugt, die peripheren Blutvorläuferzellen vom Patienten zwischen Tag 10 und Tag 18 nach der Chemotherapie zu erhalten.

Die vorliegende Erfindung umfaßt auch ein Kulturmedium für dendritische Zellen umfassend eine Kombination von IL-1, IL-3, IL-6, EPO und SCF und gegebenenfalls Interferon- $\gamma$  sowie TNF- $\alpha$ . Ein anderes erfindungsgemäßes Kulturmedium umfaßt eine Kombination von SCF, GM-CSF und TNF- $\alpha$ .

Die biologisch aktiven Verbindungen werden in den oben angegebenen Konzentrationen verwendet. Es ist möglich, geeignete Aufnahmegefäße bereitzustellen, die mit einem Kulturmedium zur Züchtung von peripheren Blutvorläuferzellen ausgestattet sind umfassend die oben beschriebene Kombination von Wachstumsfaktoren. Solche Aufnahmegefäße können Blutbeutel, Mikrotiterplatten oder Gewebekulturflaschen sein. Solche gebrauchsfertigen Aufnahmegefäße sind auch Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

#### Beispiel 1

##### Mobilisierung von peripheren Blutvorläuferzellen (PBPC)

18 Patienten wurden als Teil ihrer Induktionschemotherapie mit einer herkömmlichen Dosis VP 16 (500 mg/m<sup>2</sup>), Ifosfamid (4 g/m<sup>2</sup>) und Cisplatin (50 mg/m<sup>2</sup>) (VIP) behandelt, mit anschließender Verabreichung von rekombinantem humanem G-CSF (Amgen, Deutschland) in einer Dosis von 5  $\mu$ g/kg/d subkutan für 10 bis 14 Tage zur Mobilisierung von PBPCs. 12 Patienten mit soliden Tumoren und 6 Patienten mit refraktärem non-Hodgkin Lymphomen waren eingeschlossen. PBPCs wurden 10 bis 12 Tage nach VIP Chemotherapie gesammelt. Die peripheren Blutvorläuferzellen wurden durch Leukapheresen entnommen unter Verwendung einer sogenannten "Kleinvolumenkammer" (erhältlich von Baxter) an Tag 10—12 nach der VIP Chemotherapie gemäß dem Verfahren, das von Brugger et al. in J. Clin. Oncol. 20, S. 1452—1459 (1992) und Brugger et al., British J. of Haematology 84, S. 402—407 (1993) beschrieben wurde.

#### Beispiel 2

##### Kultur von gezüchteten PBPCs

Aus dem Aphereseprodukt wurden mononukleare Zellen (MNC) durch Dichtegradientenzentrifugation über Ficoll/Hypaque (1077 g/ml) (erhältlich von Pharmacia) isoliert und zweimal in phosphatgepufferter

Salzlösung (PBS) gewaschen.

Periphere Blut- oder Knochenmarks-MNC-Zellen wurden kultiviert wie im Stand der Technik beschrieben (z. B. Kanz et al., Blood, 68, 991 (1986)). MNC ( $1 \times 10^5$ ) wurden in Methylcellulose (0,9%) immobilisiert und in IMDM supplementiert mit 30% fötalem Kälberserum (Paesel, Deutschland) kultiviert.

#### Beispiel 3

Positive Auswahl von CD 34<sup>+</sup>-Zellen von gezüchteten PBPCs durch Immunoaffinitätsadsorptionssäulen

Mononukleare Zellen (MNCs) wurden mit einem biotinylierten IgM Anti-CD 34 monoklonalem Antikörper inkubiert, gewaschen und auf eine Avidin-Immunoaffinitätssäule aufgetragen. Adsorbierte CD 34<sup>+</sup>-Zellen (Zielzellenpopulation) wurden von der Avidinsäule entfernt und in RPMI 1640 Medium (Seromed, Deutschland) resuspendiert, das mit 3 mmol/L Glutamin und  $5 \times 10^{-5}$  mol/L  $\beta$ -Mercaptoethanol (Sigma, Deutschland) ergänzt wurde.

#### Beispiel 4

Expansion von angereicherten CD 34<sup>+</sup>-Zellen in Suspensionskultur

Angereicherte CD 34<sup>+</sup>-Zellen wurden in 96-Loch-Mikrotiterplatten mit flachem Boden kultiviert bei 0,5 bis  $15 \times 10^3$  Zellen/mL in RPMI 1640 Medium supplementiert mit 10% fötalem Kälberserum bzw. verschiedenen Konzentrationen von autologem Plasma. Die oben beschriebene Kombination von Wachstumsfaktoren wurde unmittelbar nach Aussaat der CD 34<sup>+</sup>-Zellen in die Mikrotiterplatten (Gesamtvolumen 200  $\mu$ L/Behälter) hinzugefügt. Vierfache Kulturen von jeder einzeln der getesteten 36 Wachstumsfaktor-Kombinationen wurden hergestellt. Die folgenden hämatopoetischen Wachstumsfaktoren und Cytokine wurden verwendet: IL-1, IL-3, IL-6, GM-CSF, EPO, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , SCF. Wachstumsfaktoren wie IL-1, GM-CSF, IFN- $\gamma$  und SCF in einer Konzentration von 100 ng/ml bzw. in einer Konzentration von 100 E/ml (IL-3 und IL-6). Erythropoietin wurde in einer Konzentration von 1 E/ml und TNF- $\alpha$  in einer Konzentration von 50 E/ml verwendet. Die Zellen wurden bis zu 28 Tage bei 37°C in 5% CO<sub>2</sub> inkubiert ohne zusätzliche Zugabe von Wachstumsfaktoren oder Medium. Zur Analyse wurde jeder Behälter resuspendiert und in RPMI 1640 gewaschen zur Entfernung von restlichen Wachstumsfaktoren. Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde durch Trypanblaufarbstoff-Ausschluß sowie durch durchflußcytometrische Färbung mit Propidiumiodid bewertet.

#### Beispiel 5

Herstellung dendritischer Zellen durch eine ex vivo Expansion peripherer CD 34<sup>+</sup>-Blutprogenitorzellen

CD 34<sup>+</sup>-Blutvorläuferzellen werden wie in Beispiel 4 angegeben in einer Zelldichte von 0,5 bis  $3 \times 10^4$ /ml in RPMI 1640 Medium in 25 ml Zellkulturflaschen über einen Zeitraum von max. 21 Tagen kultiviert. Dem Kulturmedium werden folgende Wachstumsfaktoren und Cytokine zugeführt: IL-1 $\beta$ , IL-3, IL-6, SCF und Erythropoietin in den unter Beispiel 4 genannten Konzentrationen. In einem zweiten Kulturansatz werden, um die

Ausbeute an dendritischen Zellen zu erhöhen, dem Medium TNF- $\alpha$ , GM-CSF sowie SCF zugesetzt.

Wöchentlich werden Proben aus den Kulturen entnommen und darin der Immunphänotyp durchflußcytometrisch mit einem FACScan-Analyzer (Becton Dickinson) analysiert. Die Daten werden mit dem FACScan Lysis 2 Software-Programm ausgewertet. Für die Zweifarben-Markierung werden die Zellen in PBS mit 2% FCS gewaschen und mit einem PE-konjugierten Antikörper gegen CD 33 zusammen mit je einem der folgenden FITC-konjugierten Antikörper für 30 Minuten bei 4°C inkubiert: Anti-HLA-DR, anti-CD 4, anti-CD 1a und anti-CD 25 (alle von Becton Dickinson). Darüberhinaus werden Einfachmarkierungen mit Antikörpern gegen CD 1b, CD 1c und CD 40 (Dyanova, Hamburg) durchgeführt. Diese Antikörpermarkierung erfolgt nach der indirekten Methode. Um den prozentualen Anteil der Zellen aus der granulozytären bzw. monozytären Reifungskaskade zu ermitteln, werden die Zellen zusätzlich mit Antikörpern gegen CD 15 (Granulozyten) und CD 14 (Monozyten) markiert. Als Negativkontrollen werden Isotypkontrollen (IgG1-FITC und IgG2a PE-konjugiert) von der Maus durchgeführt. Nach Abschluß der Inkubation werden die Zellen 2  $\times$  gewaschen und in 250  $\mu$ L PBS ohne FCS-Zusatz zur durchflußcytometrischen Analyse resuspendiert. Zum Ausschluß toter Zellen wird aus jeder Probe unmittelbar vor der Messung Propidium-Jodid (PI) zugegeben, die PI-markierten toten Zellen werden schließlich vor der Analyse entsprechend ausgegrenzt. Aus jeder Probe werden 20 000 Zellen analysiert.

#### Ergebnisse:

Nach 12 Tagen beträgt der Anteil CD 1a<sup>+</sup> Zellen in der Kultur mit TNF, GM-CSF und SCF etwa 20%, diese Zellen exprimieren zusätzlich HLA-DR-Moleküle, die ebenfalls ein Marker für dendritische Zellen darstellen. Da jedoch nur reife dendritische Zellen CD 1a exprimieren, kann deren tatsächliche Anzahl noch deutlich höher liegen. Weiterhin werden CD 1c bei ca. 17% und CD 40 bei ca. 45% der Zellen exprimiert. Auch diese Moleküle sind Marker von dendritischen Zellen.

Das Medium, welches mit IL-1, IL-3, IL-6, SCF und Erythropoietin komplementiert war, ergab zwar eine größere Anzahl klonogener Vorläuferzellen, jedoch war der Anteil an dendritischen Zellen signifikant geringer. CD 1a<sup>+</sup> Zellen wurden in ca. 4% aller ex vivo expandierten Zellen gefunden, CD 1c-exprimierende Zellen betragen 3%, CD 40-exprimierende Zellen ca. 2%.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur Bereitstellung von dendritischen Zellen, worin

- a) periphere Blutzellen vom Blut isoliert werden,
- b) periphere Blutvorläuferzellen, die das CD 34-Antigen exprimieren, angereichert werden, und
- c) diese Zellen mit einer Kombination von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren und Cytokinen kultiviert werden und gegebenenfalls anschließend
- d) die dendritischen Zellen angereichert werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, worin die peripheren Blutvorläuferzellen aus heparinisierten Blutproben durch Dichtegradientenzentrifugation isoliert werden.

3. Verfahren nach Anspruch 2, worin die peripheren Blutvorläuferzellen durch Dichtegradientenzentrifugation über Ficoll/Hypaque isoliert werden.

4. Verfahren nach Anspruch 1, worin die peripheren Blutvorläuferzellen mit einem gegen das Oberflächenantigen CD 34 gerichteten monoklonalen Antikörper umgesetzt werden.

5. Verfahren nach Anspruch 4, worin die peripheren Blutvorläuferzellen, die mit dem gegen das CD 34-Oberflächenantigen gerichteten monoklonalen Antikörper umgesetzt wurden von den nicht umgesetzten Zellen durch Behandlung mit einer Immunoaffinitätssäule, insbesondere einer Avidin-Immunoaffinitätssäule abgetrennt werden.

6. Verfahren nach Anspruch 1, worin die peripheren Blutvorläuferzellen durch Kultivieren in einem Zellwachstumsmedium expandiert werden, das Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-3 (IL-3), Interleukin-6 (IL-6), Erythropoietin (EPO) und Stammzellenwachstumsfaktor enthält.

7. Verfahren nach Anspruch 1, worin die peripheren Blutvorläuferzellen in einem Zellwachstumsmedium expandiert werden, das Stammzellenwachstumsfaktor (SCF), Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierenden Faktor (GM-CSF) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) sowie gegebenenfalls Interleukin-4 (IL-4) enthält.

8. Verfahren nach Anspruch 1, worin das Blut von Krebspatienten erhalten wird, die mit einer Chemotherapie in üblicher Dosis behandelt wurden, wobei die Chemotherapie die Anwendung von Etoposid (VP 16), Ifosfamid und Cisplatin umfaßt.

9. Verfahren nach Anspruch 8, worin das Blut von Krebspatienten erhalten wurde, die mit einer Chemotherapie behandelt wurden, gefolgt von der kombinierten, aufeinanderfolgenden Anwendung von rekombinantem Humaninterleukin-3 (rhIL-3), rekombinantem humanem Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierendem Faktor (rhGM-CSF) oder rekombinantem humanem Granulozyten-koloniestimulierendem Faktor (rhG-CSF).

10. Dendritische Zellen, erhältlich durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9.

11. Zusammensetzung von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren umfassend Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-3 (IL-3), Interleukin-6 (IL-6), Erythropoietin (EPO) und Stammzellenwachstumsfaktor (SCF).

12. Zusammensetzung von hämatopoetischen Wachstumsfaktor umfassend Stammzellenwachstumsfaktor (SCF), Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierenden Faktor (GM-CSF) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ).

13. Zusammensetzung nach Anspruch 11 oder 12, worin Interleukin-1 in einer Konzentration zwischen 10 ng/ml und 1000 ng/ml, Interleukin-3 in einer Konzentration von 1 E/ml bis 1000 E/ml, Interleukin-6 in einer Konzentration von 10 E/ml bis 1000 E/ml, Erythropoietin in einer Konzentration zwischen 0,1 E/ml und 10 E/ml, Stammzellenwachstumsfaktor (SCF) in einer Konzentration von 10 ng/ml bis zu 1000 ng/ml, GM-CSF in einer Konzentration von 10 ng/ml bis 1000 ng/ml und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  in einer Konzentration von 1 E/ml bis 1000 E/ml vorhanden ist.

14. Zusammensetzung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß sie auch Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) in einer Konzentration von 1 E/ml bis 1000 E/ml

umfaßt.

15. Behältnis für die Expansion von dendritischen Zellen, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 11 bis 14 enthält.

16. Gefäß nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Zellkulturflasche ist.

- Leerseite -